



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C07K 15/14, A61K 35/12</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/13575</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. November 1990 (15.11.90)</p>
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/00719</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Mai 1990 (04.05.90)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 39 15 072.0 9. Mai 1989 (09.05.89) DE P 39 22 089.3 5. Juli 1989 (05.07.89) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEMAIRE, Hans-Georg [DE/DE]; Flomersheimer Eck 7, D-6716 Dirmstein (DE). HILLEN, Heinz [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 17, D-6733 Hassloch (DE). MOELLER, Achim [DE/US]; 3 Carriage Lane, Winchester, MA 01890 (US). DAUM, Lothar [DE/DE]; Reiherstrasse 25, D-6701 Otterstadt (DE). DOERPER, Thomas [DE/DE]; Luitpoldstrasse 3, D-6719 Bissersheim (DE). SUBKOWSKI, Thomas [DE/DE]; Ruchheimer Strasse 1, D-6704 Mutterstadt (DE).</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), + DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </div> </div>		
<p>(54) Title: NOVEL TNF-INHIBIT PROTEINS AND THEIR PREPARATION</p> <p>(54) Bezeichnung: NEUE PROTEINE MIT TNF-HEMMENDER WIRKUNG UND IHRE HERSTELLUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Novel proteins have a molecular weight of approximately 42.000 daltons and the amino acid sequence Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu on their terminal N, where X denotes a hydrogen atom, a phenylalanine (Phe) residue or the amino acid sequences Ala Phe, Val Ala Phe, Gln Val Ala Phe, Ala Gln Val Ala Phe, Pro Ala Gln Val Ala Phe or Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe. These proteins have a therapeutic effect.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es werden neue Proteine beschrieben, welche ein Molekulargewicht von etwa 42.000 Dalton besitzen und am N-Terminus die Aminosäuresequenz Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu aufweisen, worin X ein Wasserstoffatom, einen Phenylalaninrest (Phe) oder die Aminosäuresequenzen Ala Phe, Val Ala Phe, Gln Val Ala Phe, Ala Gln Val Ala Phe, Pro Ala Gln Val Ala Phe oder Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe darstellt, und die sich zur Behandlung von Krankheiten eignen.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IT	Italien	SD	Sudan
CA	Kanada	JP	Japan	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TC	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MC	Monaco		

NEUE PROTEINE MIT TNF-HEMMENDER WIRKUNG UND IHRE HERSTELLUNG

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft neue Proteine und deren Herstellung.

TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor) ist ein bekanntes Protein, welches ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten besitzt. Er beeinflusst verschiedene maligne und nicht-maligne Zelltypen, spielt eine Rolle bei septischem

10 Schock und Gewebeerletzungen sowie Nierenabstoßungen, Transplantationen, Schocklunge und zerebraler Malaria (Lymphokines 1987 Vol. 14; Pharmaceutical Res. 5, 129 (1988); Science 234, 470 (1986); Nature 330, 662 (1987); J. Exp. Med. 166, 1132 (1987); Science 237, 1210 (1987); J. Exp. Med. 166, 1280 (1987)).

15

Es ist bekannt, daß man die Wirkung von TNF α mit Antikörpern neutralisieren kann (EP 260 610). Diese Antikörper sind jedoch nicht humane Substanzen, so daß sie bei der Anwendung am Menschen Immunreaktionen auslösen können.

20

Es wurden nun Proteine gefunden, die humanen Ursprungs sind und die Wirkung von TNF α neutralisieren können.

Gegenstand der Erfindung sind Proteine, welche ein Molekulargewicht von

25 etwa 42.000 Dalton besitzen und am N-Terminus die Aminosäuresequenzen

Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu

aufweisen, worin X ein Wasserstoffatom, einen Phenylalaninrest (Phe) oder

30 die Aminosäuresequenzen Ala Phe, Val Ala Phe, Gln Val Ala Phe, Ala Gln Val Ala Phe, Pro Ala Gln Val Ala Phe oder Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe darstellt, und deren Muteine.

Als Muteine sind Proteine zu verstehen, die durch geeigneten Austausch,

35 Deletion oder Addition von Aminosäuren oder Peptiden in der Proteinkette entstehen, ohne daß dadurch die Wirkung der neuen Proteine stark nachläßt. Die Muteine können auch durch Variation des Glykosidrestes erhalten werden.

40 Die hier beschriebenen neuen Proteine besitzen saure Eigenschaften, ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 2 bis 5. Sie binden sich spezifisch an TNF α und sind durch Trypsin schwer oder gar nicht verdaubar.

Die neuen Proteine lassen sich beispielsweise aus dem Harn von Patienten isolieren, die Fieber haben, d.h. deren Körpertemperatur etwa 38°C oder höher ist. Hierzu wird der Harn zunächst konzentriert, was beispielsweise durch Umkehrosmose oder Ultrafiltration geschehen kann. Das dadurch erhaltene Retentat wird anschließend durch Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie gereinigt.

Die Proteine lassen sich auch aus menschlicher Ascites-Flüssigkeit von Patienten mit Ovarialcarcinomen gewinnen.

10

Die Reinigung der Proteine kann nach bekannten Methoden, wie Affinitäts- oder Ionenaustauschchromatographie, erfolgen.

Die so gewonnenen Proteine sind am N-Terminus in der Aminosäuresequenz inhomogen. Es können bis zu 7 Aminosäuren fehlen. Solche Inhomogenitäten sind bei körpereigenen Proteinen nicht ungewöhnlich und treten beispielsweise auch beim γ -Interferon auf.

Durch Behandlung mit einer Endoglykosidase verändert das Protein sein Laufverhalten in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, was auf die Abspaltung von Zuckerresten zurückzuführen ist.

Die hier beschriebenen Proteine liegen im Urin und in der Ascitesflüssigkeit in Konzentrationen zwischen 1 - 100 $\mu\text{g/l}$ vor. Um das Protein für pharmazeutische Zwecke in größeren Mengen verfügbar zu machen, kann man bekannte gentechnische Methoden (vgl. Maniatis, T. et al: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1982) heranziehen. Für diesen Zweck muß zunächst die genetische Information für das neue Protein identifiziert und die entsprechende Nukleinsäure isoliert werden. Dazu wird das reine Protein mit Dithiothreitol reduziert, dann wird Iodacetamid zur Derivatisierung der freien SH-Gruppen zugesetzt und anschließend wird das so behandelte Protein mit Bromcyan und anschließend mit Trypsin in kleine Peptide gespalten. Die Auftrennung der Peptide erfolgt über reversed phase-Chromatographie. Die N-terminale Sequenzierung eines dieser gereinigten Peptide ergab die Sequenz Val Phe Cys Thr Lys. Weiter enthält das Protein folgende drei weitere Peptidsequenzen: Gly Val Tyr Thr Ser, Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr und Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Xab Thr Thr Ser Ser Asp Ile Cys Arg Pro, worin Xab eine noch unbekannte Aminosäure ist, die möglicherweise glykosyliert ist.

Die vorhandenen Peptidsequenzen erlauben nun durch die Synthese entsprechende Oligonukleotide eine eindeutige Identifizierung des Gens aus dem

menschlichen Genom oder aus entsprechenden c-DNA-Bänken durch sequenz-spezifische Filterhybridisierung.

Die so erhaltene genetische Information für das Protein kann dann in verschiedenen Wirtszellen, wie eukaryontische Zellen, Hefen, *Bacillus subtilis* oder *E. coli* nach bekannten Methoden zur Expression gebracht und das Protein so erhalten werden. In den eukaryotischen Zellen entsteht dabei das Protein in glykosylierter Form.

- 10 Die Muteine, die sich durch Austausch, Deletion oder Addition von Aminosäuren oder Peptiden von den neuen Proteinen ableiten, werden vorzugsweise nach gentechnischen Methoden dargestellt.

Die neuen Proteine zeigen gute $\text{TNF}\alpha$ -inhibierende Wirkungen und lassen sich daher zur Behandlung von Krankheiten einsetzen, bei denen die Konzentration an $\text{TNF}\alpha$ in Körperflüssigkeiten erhöht ist, wie z.B. bei septischem Schock. Weiter können sie bei folgenden Erkrankungen angewendet werden: Allergien, Autoimmunkrankheiten, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Schocklunge, entzündliche Knochenerkrankungen, Blutgerinnungsstörungen, Verbrennungen sowie bei Komplikationen nach Transplantationen.

Beispiel 1

Bestimmung der $\text{TNF}\alpha$ -inhibitorischen Wirkung

25

Die biologische Aktivität von $\text{TNF}\alpha$ wurde durch Lyse der Mauszelllinie L929 (J. Biol. Chem. 260, 2345 (1985) und der Humanzelllinie MCF7 bestimmt. Bei Versuchen zur Bestimmung der $\text{TNF}\alpha$ inhibitorischen Wirkung wurde eine Konzentration an $\text{TNF}\alpha$ gewählt, bei der mindestens 50 % der Zellen lysierten.

30

Überstände mit $\text{TNF}\alpha$ bindenden Proteinen wurden in 1:2 Schritten in Mikrotiterplatten verdünnt. Zu dieser Lösung (0,05 ml) wurden je 0,05 ml Human- bzw. Maus- $\text{TNF}\alpha$ (120 pg/ml) gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50.000 L929-Zellen in 0,1 ml Medium, das 2 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D enthielt.

- 35 Nach einer Inkubationszeit von 20-24 h bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. In Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ -bindendem Protein lysierten $\text{TNF}\alpha$ und LT (Lymphotoxin) die Zellen. Diese wurden während der Färbung abgeschwemmt. Der schützende Effekt von Überständen mit $\text{TNF}\alpha$ -bindenden Proteinen zeigte sich durch die Färbbarkeit von intakten Zellen, die zurückblieben.

40

Eine Inhibition der cytotoxischen Wirkung war sowohl gegenüber Human- $\text{TNF}\alpha$, als auch etwas schwächer gegenüber Human-LT zu beobachten, nicht jedoch bei Maus- $\text{TNF}\alpha$.

Beispiel 2**Proteinisolierung aus Urin**

5 40 l Sammelurin von Patienten mit Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) wurde über eine Hemoflow® F60 Patrone (Fa. Fresenius) filtriert, bis das Volumen des Retentatstromes auf 2,5 l aufkonzentriert war.

Das Retentat wurde anschließend zum Waschen 4 mal mit je 2,5 l 20 mM
10 Natriumphosphatpuffer pH 4,0 versetzt und die Filtration jeweils bis zum Ausgangsvolumen von 2,5 l fortgesetzt.

Das so erhaltene proteinreiche, braun gefärbte Retentat wurde über S-Sepharose® der Fa. Pharmacia (Säule: $\varnothing=5$ cm, $l=17$ cm) chromatogra-
15 phiert. Die Säule wurde vor Beginn des Auftrages mit 10 Säulenvolumina (SV) 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,5 (= Puffer I) äquilibriert und das Retentat aufgetragen. Es wurde mit 3 SV Puffer I nachgewaschen und das Wertprodukt durch Elution mit 3 SV eines 20 mM Natriumphosphatpuffers pH 6,5 (Puffer II) gewonnen.

20 Zur weiteren Reinigung wurde diese Fraktion über eine TNF-Affinitätssäule (Beispiel 4) gegeben ($\varnothing = 1,5$ cm, $l=10$ cm), die mit 10 SV Puffer III (20 mM Natriumphosphat, 140 mM NaCl, pH 7,2) äquilibriert worden war. Nach dem Auftrag wurde mit 3 SV Puffer III nachgewaschen und die TNF-bindende
25 Proteinfraction durch Elution der Säule mit 40 ml eines Puffers IV, bestehend aus 0,58 % Essigsäure und 140 mM NaCl, gewaschen.

Zur Isolierung des reinen Proteins wurde das Eluat der TNF-Affinitätssäule über eine Mono Q-Säule HR 5/5 der Fa. Pharmacia aufgetrennt. Dazu wurde
30 zunächst das Eluat mit 0,1 n NaOH auf pH 12,0 eingestellt.

Die Säule wurde mit 11 SV 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 12,0 (Puffer V) äquilibriert. 10 ml des pH-adjustierten TNF-Affinitätssäuleneluates wurde aufgetragen und mit 4,4 SV Puffer V gewaschen. Anschließend wurde mit 20
35 mM Natriumphosphat pH 7,5, eluiert.

Zur weiteren Abreicherung von Verunreinigungen wurde die Mono Q-Säule mit 7 SV 20 mM Essigsäurepuffer gespült, der mit 0,1 N HCl auf pH 2,0 eingestellt worden war (Puffer VI).

40 Danach wurde die Säule mit 5-6 SV 20 mM Essigsäure, 20 mM NH_4Cl -Puffer, pH 2,0 (mit 0,1 n HCl eingestellt, Puffer VII) weiter eluiert. Nach 1-2 SV

eluierte eine bei 280 nm UV-aktive Bande, die Verunreinigungen enthielt, nach weiteren 1-2 SV eluierte das neue Protein. Eine weitere Menge reines Protein kann durch Nachelution mit 1-2 SV eines auf 100 mM NaCl eingestellten Puffers VII erreicht werden.

5

Das Protein wurde so in einer gelelektrophoretischen Reinheit von >90 % erhalten. Aus 1 l Urin lassen sich etwa 1 bis 10 µg Protein erhalten.

Beispiel 3

10

Proteinisolierung aus menschlicher Ascitesflüssigkeit.

2,5 l leicht trübe, dünnflüssige Ascitesflüssigkeit, die als Punktat einer Patientin mit Ovarialcarcinom anfiel, wurde 30 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 %iger Phosphorsäure auf pH 7,2 eingestellt und über eine mit Glutardialdehyd vernetzte TNF-Sepharose®-Säule (vgl. Beispiel 4) gegeben. (Ø = 1,5 cm, l = 3 cm). Die Säule wurde mit 50 ml Puffer III äquilibriert und nach dem Auftrag mit 150 ml Puffer III nachgewaschen. Die TNF-bindenden Proteine wurden mit 30 ml Puffer IV eluiert.

Zur weiteren Reinigung wurde das Eluat mit 10%iger HCl auf pH 3,0 eingestellt und auf eine mit 20 mM Essigsäure (pH 3,0) äquilibrierte Chromatographiesäule (Mono S HR 5/5, Fa. Pharmacia) gegeben. Nach dem Auftrag wurde mit 10 ml 20 mM Essigsäure (pH 3,0) nachgewaschen und die TNF-bindenden Proteine anschließend durch Elution mit 4 ml eines Puffergemisches aus 6 Teilen 20 mM Essigsäure (pH 3,0) und 4 Teilen 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 9,0) eluiert. Der pH-Wert des Eluats wurde kontrolliert und gegebenenfalls auf pH 6,5 nachgestellt.

30

Das Eluat wurde über eine mit Natriumphosphatpuffer pH 6,0 (Puffer VIII) äquilibrierte Chromatographiesäule Mono Q HR 5/5 gegeben. Nach Waschen mit je 6 ml Puffer VIII und 6 ml 20 mM Essigsäure, 5 mM NaCl, pH 2,2 wurde das Protein mit 6 ml 20 mM Essigsäure, 150 mM NaCl, pH 2,0 (Puffer IX) von der Säule eluiert.

35

Die Charakterisierung des letzten Eluats ergab, daß es sich - abgesehen von der Inhomogenität der N-terminalen Sequenz - um das gleiche Protein handelt, welches gemäß Beispiel 2 erhalten wurde.

40

Beispiel 4**Herstellung der TNF-Affinitätssäule****5 a) Kopplung von TNF an BrCN-Sepharose**

7,5 g BrCN-Sepharose® (Fa. Pharmacia) wurden in 30 ml Wasser aufgeschlemmt. Nach 30 min Quellzeit wurde die BrCN-Sepharose®-Gelsuspension zuerst mit 500 ml 1 mM HCl-Lösung und dann mit 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, 10 pH 8,3, gewaschen.

136 mg TNF gelöst in 41 ml Puffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) wurden zu dieser Gelsuspension gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt und die TNF-Sepharose® bei 3000 U/min abzentrifugiert. 15 Das Gelmaterial wurde mit 40 ml Puffer gewaschen.

Aus der Proteinbestimmung der Überstände errechnet sich eine Kopplungsausbeute von >90 %.

20 Zur Blockierung der überschüssigen aktiven Gruppen der BrCN-Sepharose® wurde die Gelsuspension mit 40 ml Puffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, 1 M Ethanolamin, pH 8,3) versetzt, anschließend 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und das Ethanolamin dann mit 3 x 40 ml Puffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) ausgewaschen.

25

b) Vernetzung der TNF-Sepharose® mit Glutardialdehyd

20 ml nach a) hergestellter TNF-Sepharose® Gelsuspension wurden zweimal mit 25 ml Puffer (20 mM Natriumphosphat, 140 mM NaCl, pH 8,0) 30 gewaschen. Die Suspension wurde in 40 ml desselben Puffers aufgenommen und mit 1,6 ml 25 %iger Glutardialdehydlösung versetzt. Nach 1 h Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Suspension abzentrifugiert und mit 25 ml Puffer (20 mM Natriumphosphat, 140 mM NaCl, 1 M Ethanolamin, pH 8,0) versetzt. Es wurde wieder 1 h geschüttelt und die 35 TNF-Sepharose® Suspension anschließend in eine Chromatographiesäule (Ø=1,5 cm, l=10 cm) gefüllt.

Die Säule war nach Waschen mit 100 ml Puffer (20 mM Natriumphosphat, 140 mM NaCl, pH 7,2) und 50 ml 0,58 % Essigsäure + 140 mM NaCl für die 40 Affinitätschromatographie einsetzbar.

Beispiel 5

Charakterisierung des Proteins

5 a) Molekulargewicht und Reinheit

10 Zur Bestimmung des Molekulargewichts und der Reinheit wurden 2 µg des nach Beispiel 2 bzw. 3 erhaltenen Proteins einer 15 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen unterworfen (Nature 227, 680 (1970)). Im Vergleich mit einer Reihe bekannter Eichproteine wurde das neue Protein nach beiden Methoden nach Färbung mit Coomassie blue als homogene Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 42.000 Dalton erkannt.

15 Andere Banden waren nicht zu erkennen. Die Reinheit des Proteins kann daher mit ≥90 % angegeben werden.

Das Protein gibt sich als deutlich blau-violett gefärbte Bande zu erkennen.

20

b) N-terminale Sequenzierung

10 µg (≈250 pMol) des nach Beispiel 2 erhaltenen Proteins wurden mit einem Gasphasensequenzier N-terminal mehrmals sequenziert.

25

Die N-terminale Sequenzanalyse deutet wegen des Auftretens verwandter Nebensequenzen auf die Inhomogenität der N-terminalen Aminosäuresequenz hin. Es wurden folgende Hauptsequenzen ermittelt:

30 Sequenz 1a

Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu

35 Nebenher konnte in der Gasphasensequenzierung eine um 6 Aminosäuren N-terminal verlängerte

Sequenz 2a

40 Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr
Cys Arg Leu Arg Glu

und eine um 1 Aminosäure N-terminal verminderte

Sequenz 3a

Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu

5 ermittelt werden.

Analog wurden in dem Protein gemäß Beispiel 3 folgender Hauptsequenzen ermittelt:

10 Sequenz 1b

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr
Cys Arg Leu Arg Glu (etwa 10 %)

15 Sequenz 2b

Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys
Arg Leu Arg Glu (etwa 45 %)

20 Sequenz 3b

Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg
Leu Arg Glu (etwa 45 %)

25 d) Behandlung mit Trypsin

20 µg der neuen Proteine wurden bei pH 8,5 wie folgt behandelt:

- 30 1. Zugabe von 0,5 µg Trypsin, gelöst in 0,1 M NaHCO₃-Puffer pH 8,5;
Inkubation 16 h bei 37°C
2. Zugabe von 0,5 µg Trypsin, gelöst in 0,1 % SDS - 0,1 M NaHCO₃-
Puffer pH 8,5; Einstellen der Lösung auf 0,1 % SDS-Gehalt;
Inkubation 16 h bei 37°C.

35

Die so behandelten Proteine wurden in einer 15 %igen SDS-Polyacryl-
amidelektrophorese vergleichend mit dem Ausgangsprotein analysiert. Es
konnte kein Abbau der Proteine festgestellt werden.

40 Beispiel 6

Deglykosylierung

0,1 ml des gemäß Beispiel 2 erhaltenen Mono Q-Eluats (≈ 0,1 mg/ml Protein)
wurden mit 1 M NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Anschließend wurden 10 Units

Glykopeptidase F (Fa. Boehringer Mannheim) zugesetzt. Nach 6 h Inkubation bei 37°C wurden weitere 10 Units Enzym zugesetzt. Nach weiteren 16 h Reaktionszeit wurden 50 µl des Ansatzes lyophilisiert und in einem 15%igen SDS-Gel im Vergleich mit unbehandelten Protein analysiert. Das mit Enzym behandelte Protein zeigte ein im Vergleich zur unbehandelten Probe um etwa 3 kD vermindertes Molekulargewicht. Weitere 25 µl des Ansatzes wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, auf TNFα inhibierende Wirkung getestet. Die TNFα-inhibierende Wirkung blieb auch nach Abspaltung des Zuckeranteils voll erhalten.

10

Beispiel 7

Antikörperproduktion

15 Die in den Beispielen 2 und 3 isolierten Proteine wurden zur Produktion polyklonaler Antikörper in Kaninchen injiziert. Die Reaktivität und Spezifität der Antikörper überprüfte man mittels ELISA. Dazu wurden ELISA-Platten (Fa. Costar) mit einer Lösung von 1 µg Inhibitor- bzw. Kontrollprotein/ml 0,05 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,6 beschichtet, die unspezifische
20 Bindung mit 1 % BSA/PBS abgesättigt und mit verschiedenen Serumverdünnungen inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit biotinyliertem anti-rabbit-IgG und Streptavidin-Peroxidase, sowie TMB-Substrat. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurde je 3mal mit 0,05 % Tween-20/PBS gewaschen. Nach Abstoppen mit 2 M H₂SO₄ bestimmte man die
25 optische Dichte bei 450 nm.

Beispiel 8

Proteinnachweis in Körperflüssigkeiten

30

Zum Nachweis von TNFα bindenden Proteinen in verschiedenen Körperflüssigkeiten diente ein sandwich-ELISA. Dazu wurden ELISA-Platten (Fa. Costar) mit TNF beschichtet (5 µg/ml 0,05 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,6). Nach Absättigen mit 1 % BSA/PBS inkubierte man mit den zu untersuchenden Proben
35 z.B. Synovialflüssigkeiten von Rheumatikern. Die Detektion erfolgte mit den unter Beispiel 7 beschriebenen anti-Inhibitor-Antikörpern und biotinyliertem anti-rabbit-IgG/Streptavidin-Peroxidase/TMB-Substrat. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurde je 3mal mit 0,05 % Tween-20/PBS gewaschen. Die Extinktion bei 450 nm wurde nach Zugabe von 2 M H₂SO₄ be-
40 stimmt.

Patentansprüche

1. Proteine, welche ein Molekulargewicht von etwa 42.000 Dalton besitzen und am N-Terminus die Aminosäuresequenz

5

Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu

- aufweisen, worin X ein Wasserstoffatom, einen Phenylalaninrest (Phe) oder die Aminosäuresequenzen Ala Phe, Val Ala Phe, Gln Val Ala Phe, 10 Ala Gln Val Ala Phe, Pro Ala Gln Val Ala Phe oder Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe darstellt, und deren Muteine.

2. Proteine gemäß Anspruch 1 in deglykosylierter Form.

- 15 3. Verfahren zur Herstellung von Proteinen, welche ein Molekulargewicht von etwa 42.000 Dalton besitzen und am N-Terminus die Aminosäuresequenz

Xaa Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu

20

- aufweisen, worin X ein Wasserstoffatom, einen Phenylalaninrest (Phe) oder die Aminosäuresequenzen Ala Phe, Val Ala Phe, Gln Val Ala Phe, 25 Ala Gln Val Ala Phe, Pro Ala Gln Val Ala Phe oder Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe darstellt, und deren Muteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man den Harn von fieberigen Patienten konzentriert und das so erhaltene Retentat anschließend durch Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie reinigt.

30

35

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 90/00719

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁵ C 07 K 15/14, A 61 K 35/12																	
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; font-size: small;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%; text-align: left; padding: 5px;">Classification System</th> <th style="text-align: left; padding: 5px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">C 07 K, A 61 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: x-small; margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. ⁵	C 07 K, A 61 K											
Classification System	Classification Symbols																
Int.Cl. ⁵	C 07 K, A 61 K																
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; text-align: left; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="text-align: left; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 10%; text-align: left; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0308378 (YEDA) 22 March 1989, see the whole document ---</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Chemical Abstracts, volume 108, No.23, 6 June 1988, (Columbus, Ohio, US), P. Seckinger et al.: "A human inhibitor of tumor necrosis factor a", see page 528, abstract 203006c, & J. Exp. Med. 1988, 167(4), 1511-16 ---</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Chemical Abstracts, volume 110, No.15, 10 April 1989, (Columbus, Ohio, US), C. Peetre et al.: "A tumor necrosis factor binding protein is present in human biological fluids", see page 553, abstract 133375n, & Eur. J. Haematol. 1988, 41(5), 414-19 ---</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Chemical Abstracts, volume 110, No.23, 5 June 1989, (Columbus, Ohio, US) I. Olsson et al.: "Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine", ./.</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-3</td> </tr> </tbody> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	A	EP, A, 0308378 (YEDA) 22 March 1989, see the whole document ---	1-3	A	Chemical Abstracts, volume 108, No.23, 6 June 1988, (Columbus, Ohio, US), P. Seckinger et al.: "A human inhibitor of tumor necrosis factor a", see page 528, abstract 203006c, & J. Exp. Med. 1988, 167(4), 1511-16 ---	1-3	A	Chemical Abstracts, volume 110, No.15, 10 April 1989, (Columbus, Ohio, US), C. Peetre et al.: "A tumor necrosis factor binding protein is present in human biological fluids", see page 553, abstract 133375n, & Eur. J. Haematol. 1988, 41(5), 414-19 ---	1-3	A	Chemical Abstracts, volume 110, No.23, 5 June 1989, (Columbus, Ohio, US) I. Olsson et al.: "Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine", ./.	1-3
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³															
A	EP, A, 0308378 (YEDA) 22 March 1989, see the whole document ---	1-3															
A	Chemical Abstracts, volume 108, No.23, 6 June 1988, (Columbus, Ohio, US), P. Seckinger et al.: "A human inhibitor of tumor necrosis factor a", see page 528, abstract 203006c, & J. Exp. Med. 1988, 167(4), 1511-16 ---	1-3															
A	Chemical Abstracts, volume 110, No.15, 10 April 1989, (Columbus, Ohio, US), C. Peetre et al.: "A tumor necrosis factor binding protein is present in human biological fluids", see page 553, abstract 133375n, & Eur. J. Haematol. 1988, 41(5), 414-19 ---	1-3															
A	Chemical Abstracts, volume 110, No.23, 5 June 1989, (Columbus, Ohio, US) I. Olsson et al.: "Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine", ./.	1-3															
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"G" document member of the same patent family</p> </div> </div>																	
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 10 July 1990 (10.07.90) </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 26 September 1990 (26.09.90) </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> International Searching Authority European Patent Office </td> <td style="padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 10 July 1990 (10.07.90)	Date of Mailing of this International Search Report 26 September 1990 (26.09.90)	International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer											
Date of the Actual Completion of the International Search 10 July 1990 (10.07.90)	Date of Mailing of this International Search Report 26 September 1990 (26.09.90)																
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer																

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	see page 557, abstract 210604r, & Eur. J. Haematol 1989, 42(3), 270-5 ---	
T	The Journal of Biological Chemistry, volume 264, No.20, 15 July 1989, American Society for Bio- chemistry and Molecular Biology, Inc., (US), P. Seckinger et al.: "Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor α inhibitor", pages 11966-11973 see the whole document ---	1-3
T	The Journal of Biological Chemistry, volume 264, No.20, 15 July 1989, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., (US), H. Engelmann et al.: "A tumor necrosis factor- binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity", pages 11974-11980 see the whole document ---	1-3
P,X	The Journal of Biological Chemistry, volume 265, No.3, 25 January 1990, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., (US), H. Engelmann et al.: "Two tumor necrosis factor- binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors", pages 1531-1536 see the whole document -----	1-3

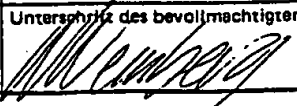
EP 9000719
SA 36484

**This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 18/09/90
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0308378	22-03-89	AU-A- 2206888 JP-A- 2000200	16-03-89 05-01-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 90/00719**

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl.⁵ C 07 K 15/14, A 61 K 35/12		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl.⁵	C 07 K, A 61 K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
A	EP, A, 0308378 (YEDA) 22. März 1989 siehe das ganze Dokument --	1-3
A	Chemical Abstracts, Band 108, Nr. 23, 6. Juni 1988, (Columbus, Ohio, US), P. Seckinger et al.: "A human inhibitor of tumor necrosis factor a", siehe Seite 528, Zusammenfassung 203006c, & J. Exp. Med. 1988, 167(4), 1511-16 --	1-3
A	Chemical Abstracts, Band 110, Nr. 15, 10. April 1989, (Columbus, Ohio, US), C. Peetre et al.: "A tumor necrosis factor binding protein is present in human biological fluids", siehe Seite 553, Zusammenfassung 133375n, & Eur. J. Haematol. 1988, 41(5), 414-19 --	1-3
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
10. Juli 1990		26.09.90
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
Europäisches Patentamt		 Natalie Weinberg

III.EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	Chemical Abstracts, Band 110, Nr. 23, 5. Juni 1989, (Columbus, Ohio, US), I. Olsson et al.: "Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine", siehe Seite 557, Zusammenfassung 210604r, & Eur. J. Haematol 1989, 42(3), 270-5 --	1-3
T	The Journal of Biological Chemistry, Band 264, Nr. 20, 15. Juli 1989, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., (US), P. Seckinger et al.: "Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor α inhibitor", Seiten 11966-11973 siehe den ganzen Artikel --	1-3
T	The Journal of Biological Chemistry, Band 264, Nr. 20, 15. Juli 1989, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., (US), H. Engelmann et al.: "A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity", Seiten 11974-11980 siehe den ganzen Artikel --	1-3
P,X	The Journal of Biological Chemistry, Band 265, Nr. 3, 25. Januar 1990, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., (US), H. Engelmann et al.: "Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors", Seiten 1531-1536 siehe den ganzen Artikel -----	1-3

EP 9000719
SA 36484

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 18/09/90
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0308378	22-03-89	AU-A- 2206888 JP-A- 2000200	16-03-89 05-01-90

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82